

<i>Nereis. Revista Iberoamericana Interdisciplinar de Métodos, Modelización y Simulación</i>	10	161-176	Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir	Valencia (España)	ISSN 1888-8550
--	----	---------	---	-------------------	----------------

Identificación de cultivos de levaduras noruegas y estudio de sus propiedades de fermentación

Identification of Norwegian yeast cultures and study of their fermentation properties

Fecha de recepción y aceptación: 6 de octubre de 2017, 9 de enero de 2018

Paula Izquierdo Sesa¹, Mónica Díez-Díaz^{1*} y Per Bruheim²

¹ Facultad de Veterinaria y Ciencias Experimentales. Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir.

² Departamento de Biotecnología y Ciencia de los Alimentos de la Universidad de Ciencia y Tecnología de Noruega (NTNU).

* Correspondencia: Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir. Facultad de Veterinaria y Ciencias Experimentales. Calle Guillem de Castro, 94. 46001 Valencia. España. *E-mail*: monica.diez@ucv.es



RESUMEN

Las levaduras son los microorganismos más utilizados en el proceso de fermentación de alimentos. Son de especial importancia en el proceso de fermentación de la cerveza, ya que es la bebida fermentada más consumida del mundo. En este proyecto se investigaron cuatro cepas distintas de levaduras provenientes de granjas de los municipios de Noruega, Ål y Hornindal, en concreto NFAY 29, NFAY 30, NFAY 31 y NFAY 32. Por otro lado, se emplearon cuatro controles, uno de ellos cedido por la colección nacional de levaduras de Reino Unido (NCYC 456), otros dos por WhiteLabs (WLP013 y WLP500) y el último por una granja noruega (G561). El objetivo fue realizar una identificación genética de cada una de estas cepas y el estudio de sus propiedades de fermentación. Para llevar a cabo los análisis genéticos se realizó una clasificación taxonómica basada en la subunidad grande 28 S del ribosoma (LSU), para averiguar el género, y en la región interna espaciadora transcrita (ITS), para identificar la especie a la que pertenecían. Para el estudio de las propiedades de fermentación contamos con las técnicas de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas con inyección en espacio de cabeza (HS/GC-MS), la cual reveló claras diferencias entre fermentaciones a distintas temperaturas. También realizamos un análisis de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS), con la que determinamos la capacidad de utilizar maltotriosa, uno de los principales sustratos que utilizan las levaduras para crecer.

PALABRAS CLAVE: *química de alimentos, levadura, fermentación, cerveza.*

ABSTRACT

Yeasts are the microorganisms mostly used in the fermentation process of food and beverages. They are especially important in the process of beer fermentation, which is the most consumed fermented beverage in the world. In this project, four different strains of yeasts from farms in Norway's municipalities Ål and Hornindal, specifically NFAY 29, NFAY 30, NFAY 31, NFAY 32, were used. Besides, we used four controls; one of them was provided by the National Yeast Collection of UK (NCYC 456), two of them by WhiteLabs (WLP013 and WLP500) and the last

one by a farmhouse in Norway (G561). The objective was to perform a genetic identification of each of these strains and the study of their fermentation properties. To carry out the genetic analysis, a taxonomic classification was made, based on the large subunit 28S ribosomal RNA (LSU) to find out the genus, and in the transcribed internal space region (ITS) to identify the species to which they belonged. To carry out the study of the properties of fermentation, we used the techniques of gas chromatography coupled mass spectrometry with head space injection (HS/GC-MS) which revealed clear differences between fermentations at different temperatures; and analysis of liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS), which allowed us to determine the ability to use maltotriose, one of the main substrates used by yeasts to grow.

KEYWORDS: *Food Chemistry, Yeast, Fermentation, Beer.*

INTRODUCCIÓN

Las levaduras son hongos unicelulares que en biotecnología tienen gran relevancia en los sectores alimentario, farmacéutico, químico, agrícola y medioambiental, entre otros. Son el grupo de microorganismos eucariotas más importante utilizado en el proceso de fermentación de comidas y bebidas. Cabe destacar algunas de las características de las cepas de especial interés, como su capacidad de supervivencia en ausencia de oxígeno, su desarrollo gracias a la presencia de azúcares y su gran facilidad para la propagación en el laboratorio. Además, poseen un genoma de pequeño tamaño, lo que las hace atractivas para estudios genómicos evolutivos y funcionales [1-3].

El fenotipo del sabor es una propiedad extremadamente importante cuando se seleccionan levaduras. Los componentes que influyen en el sabor están afectados principalmente por características poligenéticas que tienen efecto sobre la tolerancia al alcohol, la temperatura o la tasa de fermentación. Las levaduras cerveceras se clasifican en dos especies: *Saccharomyces pastorianus* y *Saccharomyces cerevisiae* [4,5].

Las cepas industriales hoy en día son el resultado de siglos de domesticación humana y son genética y fenotípicamente distintas de las cepas salvajes. La domesticación consiste en la selección humana de especies silvestres para obtener variantes que prosperen en ambientes artificiales. Esta domesticación ha llevado a una pérdida de habilidades de supervivencia fuera de un ambiente artificial de medios ricos, y a la aparición de rasgos deseables como la utilización de la maltotriosa, la cual es importante para el desarrollo de las levaduras [6].

MÉTODOS

Obtención y desarrollo de levaduras puras

Las cepas de levaduras utilizadas en el presente trabajo fueron NFAY 29, NFAY 30, NFAY 31 y NFAY 32, donadas por granjas noruegas. Por otra parte, se emplearon cuatro controles. Uno de ellos fue cedido por la colección nacional de levaduras de Reino Unido (NCYC 456, *Saccharomyces*



Pastorianus), otros dos por WhiteLabs (WLP013 y WLP500, ambas *Saccharomyces cerevisiae*) y el último por una granja noruega (G561 *S. cerevisiae*).

Se sembraron las cepas de levadura en placas Petri en medio Wort de la compañía Fluka Analytical, posteriormente se aislaron colonias, mediante la técnica de siembra de triple estria, y se obtuvieron cepas puras. Esta técnica se practicó cuatro veces, dejando periodos de cuatro días entre siembras para permitir el crecimiento.

Una vez obtenidas las cepas puras, se inocularon en medio Malt Extract (ME) al 5 %, de la casa comercial VWR, el cual es muy favorable para el desarrollo de las levaduras.

También se realizaron pruebas adicionales con distintos medios, como Wallerstein Laboratories Nutrient Agar (WLN) y Wallerstein Laboratories Differential Agar (WLD), de la compañía Sigma Aldrich.

El primero de ellos nos permitió observar el crecimiento de organismos como levaduras y bacterias, mientras que el segundo fue indicativo de presencia de bacterias. En cuanto a su composición, se trataban de dos medios con la misma composición, a excepción de la cicloheximida, componente que inhibe la síntesis proteica en organismos eucariotas, que solamente se encontraba en WLD. La incubación aeróbica de estos medios se realizó a 27 °C.

Producción de cerveza y fermentación

Se añadieron las distintas levaduras al mosto obtenido (tal y como se describe en la receta, anexo A), y se realizó la fermentación a dos temperaturas, 22 y 35 °C, para estudiar las diferencias. El proceso de fermentación se llevó a cabo durante catorce días.

Análisis genéticos

La región interna espaciadora transcrita (ITS) ha sido seleccionada como diana de referencia para la identificación de la especie en hongos. La subunidad grande (LSU) 28S de las levaduras permite averiguar el género al que estas pertenecen. LSU contiene dos regiones hipervariables, LSU1 (pares de bases de la 127 a la 264) y LSU 2 (pares de bases de la 423 a la 636), que fueron analizadas [7-10].

Por otro lado, las levaduras de cerveza, especialmente las domesticadas, muestran una alta capacidad de metabolizar maltotriosa, una fuente de carbono específica encontrada en la cerveza. Los transportadores conocidos de α -glucósido en *S. cerevisiae* permiten una utilización eficiente de la maltosa y maltotriosa. MALL 11 es uno de estos transportadores, el cual posee un alelo específico, AGT1, cuya presencia se correlaciona con una eficiente utilización de la maltotriosa por parte de las levaduras. Por todo esto, también se decidió realizar un análisis del transportador de alfa glucósido (AGT1) [11].

Las regiones de interés se amplificaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para cada amplificación se hizo uso de unos cebadores específicos, los cuales se detallan en la siguiente tabla.



Tabla 1. Cebadores utilizados en los análisis genéticos

REGIÓN	CEBADOR	SECUENCIA NUCLEOTÍDICA	PROVEEDOR
ITS	ITS1-F_KYO2 (F)	TAGAGGAAGTAAAAGTCGTAA	Sigma-Aldrich
-	ITS4 (R)	TCCTCCGCTTATTGATATGC	Sigma-Aldrich
LSU1	LSU1 (F)	TTGCCTTAGTAACGGCGA	Sigma-Aldrich
-	LSU1 (R)	TTGTGCACCTCTTGCGAG	Sigma-Aldrich
LSU2	LSU2 (F)	GGGTTGATATGATGCC	Sigma-Aldrich
-	LSU2 (R)	TTCCCCTTGCCGTACC	Sigma-Aldrich
AGT1	AGT1 (F)	TTGCTTTACAATGGATTGGC	Sigma-Aldrich
-	AGT1 (R)	CTCGCTGTTTTATGCTTGAGG	Sigma-Aldrich

Los parámetros de la PCR variaron según la región que se analizaba. Para las regiones LSU1 y LSU2 se realizó un ciclo de desnaturalización de 10 min a 94 °C, seguido de 35 ciclos de: desnaturalización a 94 °C durante 45 s; hibridación a 52 °C 45 s; elongación a 72 °C 1 min, y por último un ciclo de elongación final de 72 °C durante 10 min.

Para la región ITS se realizó un ciclo de desnaturalización a 95 °C 10 min, 35 ciclos de: desnaturalización 94 °C 20 s; hibridación a 47 °C 30 s; elongación a 72 °C 40 s, y por último un ciclo de elongación final de 72 °C durante 7 min.

Para AGT1 un ciclo de desnaturalización a 94 °C 3 min, 35 ciclos de: desnaturalización 94 °C 1 min, hibridación 58 °C 2 min, elongación 72 °C 2 min, y por último un ciclo de elongación final de 72 °C durante 10 min.

La presencia de ADN en las muestras tras la PCR se comprobó mediante electroforesis. Los geles se visualizaron utilizando el transiluminador UV-Visible G: BOX de Syngene y el software GeneSnap.

A continuación se purificaron los amplicones con el *kit* QIAquick PCR Purification de la casa comercial Qiagen, siguiendo las indicaciones del fabricante. Las muestras fueron secuenciadas por la empresa GATC Biotech.

Una vez obtenidos los resultados de la secuenciación se procesaron con el programa CloneManager para obtener la secuencia nucleotídica definitiva, que fue analizada con las herramientas del Proyecto de base de datos ribosomal (RDP). En concreto, 16SrRNA training set 16 para LSU1 y LSU 2 y Warcup Fungal ITS trainset 2 para ITS.

En cuanto a AGT1, se analizó con el programa Seaview para analizar si el gen estaba presente o defectivo.

Análisis químicos

Cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría de masas con inyección en espacio de cabeza (HS/GC-MS)

La cromatografía de gases con inyección en espacio de cabeza, o *HeadSpace* (HS/GCMS), es una técnica ideal para el análisis cualitativo o cuantitativo de especies volátiles. En cerveza resulta muy



útil, ya que revela la identidad y concentración de aquellos componentes volátiles que son responsables del sabor [12,13].

El método del estándar interno (ISTD) proporciona una cuantificación muy precisa y por lo tanto es el método más comúnmente utilizado. El estándar interno corrige las pérdidas durante las etapas de separación y concentración, además de la variación en la cantidad de muestra inyectada [14].

Las condiciones experimentales para realizar HS-GC/MS se encuentran en la siguiente tabla.

Tabla 2. Condiciones experimentales de HS-GC/MS

PARÁMETRO	CARACTERÍSTICAS
Tipo de columna	Aglient J&W DB-624 UI, 30 m x 0,25 mm, 1,4 µm
Gas portador	Helio, flujo constante, 1,8 ml/min
Horno	35 °C (5,66 min), 8,8 °C/min a 100 °C (1,7 min), 13,3 °C/min a 220 °C (3,39), 22,1 °C/min a 250 °C (3,43 min)
Temperatura de la fuente	230 °C
Temperatura cuadrupolo	150 °C

Para preparar el ISTD se utilizó una solución de 4-methylpentan-2-ol a una concentración de 100 µg/ml.

Se prepararon las series de calibrado A (tabla 3), B (tabla 4) y C (tabla 5), que contenían los componentes volátiles que queríamos cuantificar en nuestras muestras.

Tanto a las muestras como a las series de calibrado se les añadió el ISTD.

Tabla 3. Preparación de la serie de calibrado A

	A	Peso (mg)	Volumen (ml)
1	Propan-1-ol	45-50	
2	Etanoato de etilo	45-55	
3	2-methylpropan-1-ol	35-45	20 (EtOH/H ₂ O, 50:50, v/v)
4	3-metilbutan-1-ol	65-75	
5	2-metilbutan-1-ol	40-50	

Tabla 4. Preparación de la serie de calibrado B

	B	Peso (mg)	Volumen (ml)
6	Butan-1-ol	35-45	
7	Propionato de etilo	30-40	
8	Acetato de propilo	20-30	20 (EtOH/H ₂ O, 80:20, v/v)
9	1,1- Dietoxietano	20-30	
10	Acetato de isobutilo	20-30	



Tabla 5. Preparación de la serie de calibrado C

	C	Peso (mg)	Volumen (ml)
11	1-Butirato de etilo	20-30	20 (EtOH/H ₂ O, 50:50, v/v)
12	Acetato de isoamilo	18-25	
13	Hexanoato de etilo	18-25	
14	Octanoato de etilo	20-30	
15	Decanoato de etilo	40-50	

El instrumento utilizado para analizarlas fue el Sistema 7890A GC, acoplado con el sistema GC-MS 7000 Series Triple Quadrupole, de la casa comercial Agilent. El software para conseguir y analizar los datos fue MassHunter.

Los resultados obtenidos en ng/ml fueron transformados a partes por millón (ppm) para una mejor interpretación.

Cromatografía líquida acoplada a espectrofotometría de masas (LC-MS) para el análisis de azúcares

Un sistema de cromatografía líquida acoplada a espectrofotometría de masas (LC-MS) contiene una interfaz que transfiere los componentes separados de la columna cromatográfica a la fuente de iones MS. La interfaz es necesaria porque los dispositivos LC y MS son fundamentalmente incompatibles, ya que la fase móvil en un sistema de LC es un líquido presurizado y en los analizadores de MS se opera normalmente bajo vacío [15].

Gracias a esta técnica es posible realizar un análisis de los componentes líquidos en la fermentación de la cerveza, analizando así la presencia de azúcares como la maltotriosa, el segundo azúcar más abundante del mosto de cerveza, que es utilizado por las levaduras para crecer y desarrollarse y producir así el proceso de fermentación [6].

Las condiciones experimentales para realizar la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 6. Condiciones experimentales de LC-MS

PARÁMETRO	CARACTERÍSTICAS
Tipo de columna	ACQUITY UPLC® BEH Amida. Columna de 1.7µm
Temperatura de la columna	35 °C
Solvente A	H ₂ O/ACN(70/30)+0,1 %NH ₄ OH
Solvente B	ACN/H ₂ O(80/20)+0,1 %NH ₄ OH
Método de espectrometría de masas	Ms escaneo y MSE, en modo negativo, escanear 50-2000 m/z, 4 escaneados/segundo
Fuente	Capilar 2,80 kV, cono de muestreo 25
Temperaturas	Fuente 120 °C, desolvatación 350 °C



Se utilizó un control de calidad (QC), consistente en una mezcla de todas las muestras que se iban a analizar, proporcionando así un promedio de todos los metabolitos contenido en ellas. También realizamos un blanco, el cual solo contenía agua. Y por último, una mezcla de azúcares, cuya composición se puede observar en la tabla 7. Todos estos preparados debían ser inyectados cada diez muestras.

Tabla 7. Composición de la mezcla de azúcares

COMPONENTE	g/mol	COMPONENTE	g/mol
Glucosa	180,16	Maltotriosa	504,40
Maltosa	342,30	Maltotetraosa	666,60
Sucrosa	342,30	Maltopentosa	828,70
Fructosa	180,16	Maltohexosa	990,90
Lactosa	342,30	Maltoheptosa	1153,00
Galactosa	180,16		

En la preparación de las muestras que debían analizarse se añadía acetonitrilo puro, para la eliminación de proteínas. Las muestras eran almacenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su procesado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cultivos de levaduras

A partir de la observación de las cepas puras tuvimos sospechas de que la cepa NFAY 31 no era levadura, puesto que las escasas colonias eran casi invisibles y demasiado pequeñas, teniendo así una forma más parecida a la de la bacteria. Desde ese momento dejamos a esta cepa fuera del experimento.

Para los cultivos NFAY 29, NFAY 30 y NFAY 32 se obtuvieron colonias con aspecto propio de levadura, de las cuales se escogieron distintas colonias para comprobar que los resultados eran reproducibles. Por lo tanto, al final obtuvimos tres cepas de NFAY 29 (NFAY 29.1, NFAY 29.2 y NFAY 29.3), otras tres de NFAY 30 (NFAY 30.1.1, NFAY 30.1.2 y NFAY 30.2) y cuatro de NFAY 32 (NFAY 32.1.1, NFAY 32.1.2, NFAY 32.2.1 y NFAY 32.2.2).

El color y la morfología de las levaduras en el medio Wallerstein Laboratories Nutrient Agar (WLN) no son decisivos para clasificarlas, pero sí que ofrecen una ligera idea acerca de con qué cepas se está trabajando. Analizando las placas se podía intuir que todas ellas eran del género *Saccharomyces*, por sus colores y morfologías. Sin embargo, podrían pertenecer a distintas especies. Por su color verde claro-blanco, podíamos aventurar que todas las cepas del cultivo NFAY 32 y los controles WLP500 y G561 eran *Saccharomyces cerevisiae*. Sabíamos previamente que WLP013 y WLP500 eran *S. cerevisiae*, lo cual nos proporcionó una mayor fiabilidad [16].

En cuanto a NFAY 30 y WLP013, observamos un color verde botella que es indicativo de levaduras fenólicas, es decir, levaduras que producen fenoles, compuestos orgánicos aromáticos.

Las cepas del cultivo NFAY 29 y NCYC 456 poseían un aspecto aplanado, lo que podía significar que no pertenecían a la especie *cerevisiae*. Sabíamos que esto era acertado, al menos para NCYC 456,



ya que era un control correspondiente a *Saccharomyces pastorianus*, lo cual concordaba con el resultado de la placa [17].

En cuanto a las placas preparadas con Wallerstein Laboratories Differential Agar (WLD) no se obtuvo ningún tipo de colonia, por lo que no tuvimos motivos para sospechar que ninguna de las muestras contuviese bacteria.

Análisis genéticos

Para realizar los análisis genéticos se llevó a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar el ADN. Se obtuvo banda de ADN en gel de electroforesis para las regiones ITS, LSU1 y LSU2 de todas las cepas. Sin embargo, para AGT1 se obtuvo banda de ADN para todas excepto la NFAY 32.2.1.

Los resultados de la secuenciación para las regiones LSU 1 y LSU 2 fueron concluyentes para todas las cepas. Pertenecían al género *Saccharomyces* con una fiabilidad mayor del 99 %.

En cuanto a ITS, para las muestras del cultivo NFAY 29 no se consiguieron buenos resultados. Que la secuenciación del ADN de la región ITS en NFAY 29 fuese fallida podía deberse a que se tratara de una cepa híbrida, ya que como Kopecká *et al.* [18] sugirieron, múltiples tipos de regiones ITS en cepas de cerveza híbridas pueden hacer que su análisis sea más costoso.

Sin embargo, se observó con una fiabilidad mayor del 98 % que NFAY 30 pertenecía a *Saccharomyces boulardii*.

Se trataba de un resultado muy interesante, ya que Czerucka *et al.* [19] demostraron en su trabajo que *S. boulardii* es una levadura potencial para la fabricación de probióticos.

En lo que respecta al cultivo NFAY 32, se trataba de *S. cerevisiae* con una fiabilidad mayor del 90 %. Además, este resultado concordaba con las pruebas anteriormente realizadas con el medio WLN, donde ya podíamos intuir que correspondía a *S. cerevisiae*.

En cuanto al análisis de AGT1, sabíamos que la expresión potenciada de AGT1 estaba relacionada con una mayor captación de maltotriosa en levaduras Ale, mientras que en Lager está mutado [11].

Las levaduras Lager tienen mutaciones de desplazamiento de marco de lectura en AGT1. Para analizar si nuestras cepas poseían la mutación o no estudiamos la posición número 1183, posición que Vidgren, Ruohonen y Londesborough [20] describieron como el lugar donde comienza la mutación que produce el cambio de marco de lectura.

En la tabla 8 se puede ver de manera clara si el gen está presente, ausente o defectivo, es decir, presente pero mutado.

Como hemos mencionado, no obtuvimos resultado de banda de ADN en el gel de electroforesis para NFAY 32.2.1, lo cual resultaba extraño, ya que las demás cepas provenientes del mismo cultivo sí lo poseían. Esto nos hizo pensar que quizás hubo algún problema en el análisis genético, aunque era poco probable, ya que las cepas tenían un aspecto morfológico similar. Este resultado también pudo ser debido a que fuesen cepas distintas y poseyese, en lugar de AGT1 como transportador principal de maltotriosa, otro transportador [21].

Respecto al resto de muestras, las provenientes del cultivo NFAY 29 y NCYC 456 tenían la T adicional, lo que las convertía en cepas mutadas.



En concreto, NCYC 456 se trata de una cepa comercial domesticada, por lo que no es de extrañar que posea la mutación, puesto que se ha descrito que la delección de este gen es propia y beneficiosa para levaduras Lager [22].

En cuanto a NFAY 29, Gallone *et al.* [6] obtuvieron en su estudio que alrededor del 25 % de sus levaduras *S. cerevisiae* (Ale) también poseían la T extra, lo que nos llevaba a reafirmar la teoría que está tomando cada vez más consideración, que esta mutación, aunque sí es más característica de Lager, no es exclusiva de estas.

Tabla 8. Presencia de AGT1 en las muestras

MUESTRA	AGT1	MUESTRA	AGT1
NFAY29.1	M	NFAY 32.1.2	P
NFAY29.2	M	NFAY 32.2.1	N
NFAY29.3	M	NFAY 32.2.2	P
NFAY30.1.1	P	G561	P
NFAY30.1.2	P	NCYC 456	M
NFAY30.2	P	WLP013	P
NFAY32.1.1	P	WLP500	P

*P = presente; M = mutado; N = no presente.

Identificación de componentes volátiles tras la fermentación

Con objeto de examinar los componentes volátiles que contribuyen al aroma y sabor de la cerveza se realizó HS-GC/MS en las muestras tras la fermentación a 22 y 35 °C para cuantificar 15 compuestos diferentes: butan-1-ol, acetato de propilo, 1,1 dietoxietano (más comúnmente conocido como acetal), propionato de etilo, actato de isobutilo, butirato de etilo, 3-metilbutan-1-ol acetato, propano-1-ol, acetato de etilo, 2-metilpropan-1-ol, 3metilbutan-1-ol, 2-metilbutan-1-ol, etil hexanoato, etil octanoato y etil decanoato. En cuanto a los tres últimos componentes, T. Zambrano y M. Raigón [23] los identifican en su estudio como componentes relevantes en la fermentación de la cerveza. Sin embargo, en nuestro experimento no se obtuvo suficiente cantidad en las muestras para que fuese representativo.

Gracias a los trabajos de Baxter y Hughes [24] y Maarse [25] sabemos qué aroma produce cada componente, por lo que podemos deducir qué tipo de aroma producirá cada una de nuestras levaduras de acuerdo con el tipo de componentes que producen.

De forma general, hay sabores que no suelen ser deseables, mientras que hay otros por los que se puede tener preferencias. Entre los sabores que podemos encontrar indeseables se encuentran los sabores ácidos, como el que puede producir la manzana en ocasiones, o el sabor amargo.

Las cervezas Ale tienden a ser afrutadas, y los ésteres son los que proporcionan mayoritariamente este aroma, por lo que es de esperar que nuestras muestras contengan gran cantidad de ésteres [26].

Pudimos observar que WLP500 fermentó mejor a 22 °C. A esta temperatura se obtuvo una clara influencia de ésteres que aportan aromas de banana, piña o pera, es decir, un aroma más afrutado. Sin embargo, a 35 °C tenía más concentración de componentes que proporcionan aroma manzana,



que como ya hemos mencionado puede desembocar en un sabor desagradable. De esta cepa control conocíamos que su fermentación óptima era alrededor de 20 °C, hecho que pudimos corroborar tras realizar el experimento [16].

De acuerdo con la compañía White Labs, pudimos afirmar que WLP013 fermentaba mejor a 22 °C, produciendo a 35 °C una concentración alta de acetal, lo que podría desembocar en un sabor amargo [16].

NCYC 456 obtuvo una fermentación baja en comparación con las demás. Sin embargo, el simple hecho de que fermentase fue sorprendente, ya que las levaduras Lager no soportan temperaturas de 35 °C [18].

G561 se trataba de una cepa silvestre, por lo que no teníamos datos previos. El resultado fue una buena fermentación sin diferencias destacables entre ambas temperaturas experimentales, con posibilidad de obtener un sabor amargo por la presencia de acetal en ambas.

Pese a que las cepas de NFAY 29 fermentaron todas de manera muy similar, podríamos destacar que lo hicieron mejor a 35 °C. Los componentes que predominaron son los que ofrecen aromas afrutados.

En cuanto a las cepas de NFAY 30 produjeron una fermentación similar a 22 y a 35 °C. Sin embargo, podríamos destacar una mayor presencia de acetal a 35 °C, lo que podría ser indicativo de un sabor más amargo a esta temperatura que a 22 °C.

Por último, respecto a las cepas del cultivo NFAY 32 podemos decir que fermentaron mejor con carácter general a 35 °C, ya que produjo más altas concentraciones de los componentes.

Determinación de maltotriosa en la cerveza

Procesamos los resultados con el programa Progenesis y pudimos obtener información de todos los componentes líquidos presentes en la cerveza. Para la interpretación de los resultados realizamos un diagrama de análisis de componentes principales (PCA), realizado con el software Unscrambler X, que podemos observar en la figura 1. El algoritmo utilizado fue el de Descomposición en valores singulares (SVD). El PCA nos ayudó a apreciar de manera global cómo utilizaron las cepas los azúcares presentes en la cerveza. En él pudimos observar la presencia de las muestras, los controles, los controles de calidad (QC), la mezcla de azúcares y los blancos.

Los puntos blancos estaban muy alejados de las muestras, alguno de ellos incluso fuera del rango de metabolitos, lo cual fue positivo, ya que su composición era exclusivamente agua. En cuanto a las mezclas de azúcares, los obtuvimos dentro del rango de metabolitos, lo que era esperado ya que contenía los azúcares que debían analizarse. Por otro lado, es importante señalar que el hecho de que no se encontrasen cerca de las muestras no fue indicativo de que las muestras no poseyeran azúcares, sino de que las muestras no contuvieran exclusivamente azúcares, pues también poseían otros compuestos hidrosolubles.

En lo que respecta a las muestras, que estuvieran todas solapadas y dentro del rango de metabolitos era indicativo de que, en general, tenían la misma fracción hidrosoluble. Las cepas control y la mayoría de controles de calidad (QC) no se podían apreciar porque estaban solapadas por debajo de las muestras. En la figura 2 encontramos el mismo PCA con ampliación en la zona de las muestras, para así observar las cepas control y QC.



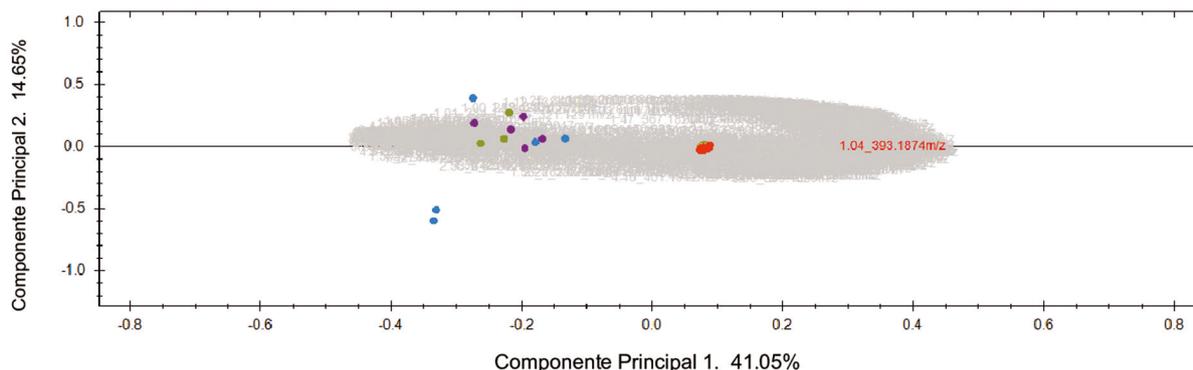


Figura 1. Análisis de componentes principales (PCA) de los componentes analizados por LC-MS. Naranja, muestras NFAY; verde, control de calidad (QC); morado, mezcla de azúcares; azul, blanco con agua.

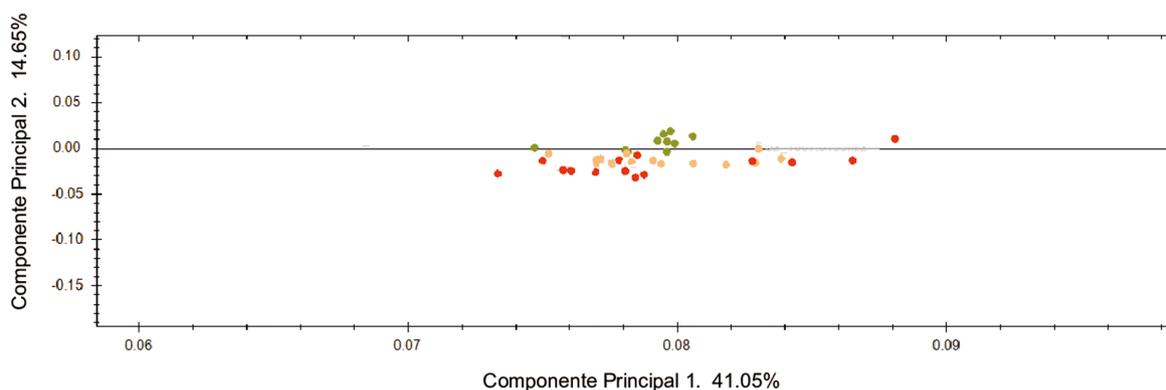


Figura 2. Análisis de componentes principales (PCA) con ampliación de tamaño. Podemos identificar las muestras (naranjas), los controles de calidad (verdes) y las cepas control (rosa claro).

En el PCA ampliado pudimos observar la presencia de las muestras, las cepas control y los controles de calidad. Que las cepas experimentales y las cepas control estuvieran solapadas significaba que tenían la misma fracción hidrosoluble. Puesto que los QC consistían en una mezcla de todas las muestras, era lógico que se encontraran cerca de estas.

Realizamos además otro PCA para el análisis de los cien componentes más abundantes de las muestras (figura 3). Esto nos reveló que la fracción líquida de la cerveza era diferente para las muestras que habían fermentado a 22 °C y las que lo habían hecho a 35 °C.



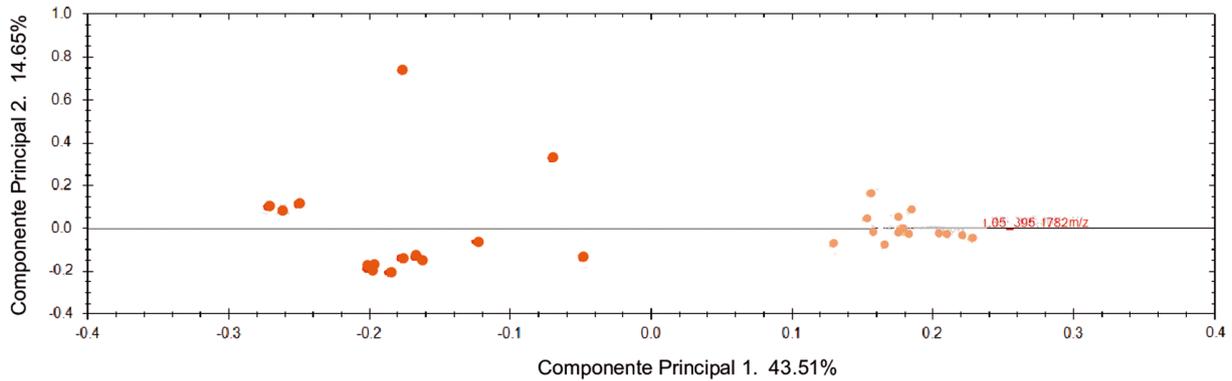


Figura 3. Análisis de componentes principales (PCA) de los 100 componentes más abundantes presentes en las muestras a 22 y 35 °C. *Naranja = 22 °C; rosa claro = 35 °C.

Por otro lado, se analizó exclusivamente el componente de la maltotriosa con el programa *Progenesis*, lo que resultó de gran interés puesto que habíamos realizado previamente análisis genéticos del transportador de alfa glucósido (AGT1).

Se examinó de este modo qué muestras tenían más maltotriosa presente y, por lo tanto, la utilizaban menos en la fermentación. Este análisis se puede ver en la siguiente figura.

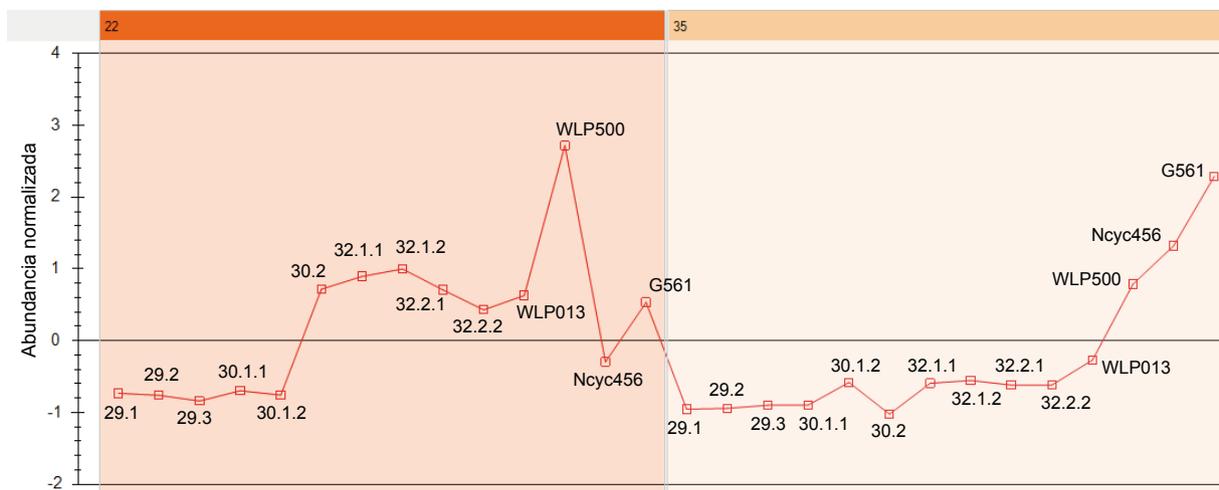


Figura 4. Representación ofrecida por el programa Progenesis de la abundancia normalizada de maltotriosa en las muestras. *Naranja = 22 °C; rosa claro = 35 °C.

Estos perfiles de abundancia normalizados no eran cuantitativos, pero fueron útiles para comparar las muestras entre ellas.



Las cepas del cultivo NFAY 29 fueron las que utilizaron la maltotriosa de un modo más eficiente en la fermentación a ambas temperaturas. Esto fue muy interesante porque sabíamos que tenían AGT1 mutado. No averiguamos la especie a la que pertenecían y podrían ser Lager, lo cual tendría sentido porque significaría que otro transportador diferente a AGT1 sería el encargado de la maltotriosa. Sin embargo, esto fue dudoso, ya que las cepas del cultivo NFAY 29 fermentaron mejor a 35 °C y las Lager fermentan mejor a temperaturas más bajas.

En cuanto a las cepas del cultivo NFAY 30, todas ellas utilizaban la maltotriosa igual de eficientemente a ambas temperaturas, exceptuando NFAY 30.2, que a 22 °C no la utilizó.

Las cepas del cultivo 32 utilizaron notoriamente la maltotriosa de manera más eficaz a 35 que a 22 °C. Durante los análisis genéticos concluimos que la cepa NFAY 32.2.1 no poseía AGT1. Sin embargo, pudimos observar que utiliza la maltotriosa con igual eficacia que el resto de cepas de su cultivo, lo que reforzaba la teoría que ha tomado más fuerza recientemente, que la mutación en AGT1 no es exclusiva de Lager pues algunas levaduras Ale pueden poseerla también.

En las muestras fermentadas con la levadura G561 se encontró presente una cantidad considerable de maltotriosa, lo que indicaba que no la utilizó de un modo óptimo.

El resultado de NCYC 456 nos informó de que utilizó la maltotriosa mejor a 22 °C. Este resultado era el esperado, puesto que se trata de una cepa Lager, y aunque tenía AGT1 mutado, se han encontrado otros tres tipos de transportadores de maltotriosa en levadura Lager.

CONCLUSIONES

Mediante la identificación de las cepas podemos llegar a la conclusión de que las cepas pertenecientes al cultivo NFAY 30, que corresponden a *Saccharomyces boulardii*, podrían ser muy prometedoras en el sector de creciente interés de los alimentos probióticos. Al tratarse de una cepa de levadura probiótica, podría emplearse para la fabricación de una cerveza probiótica, que conferiría propiedades beneficiosas para la salud.

También es muy interesante el hecho de que existen levaduras que son generalmente capaces de fermentar la maltotriosa pero que contienen varias mutaciones de desplazamiento de marco de lectura en MAL11, como es el caso de NFAY 29. Además, con el resultado obtenido de la cepa NFAY 32.2.1, apoyamos la teoría de que la mutación en AGT1 no es exclusiva, aunque sí predominante, de levaduras Lager.

Por otro lado, la influencia de la temperatura en el perfil del sabor es notoria. Las cepas NFAY producen componentes volátiles que podrían aportar sabores únicos gracias a su buena fermentación a 35 °C. También podemos destacar la diferencia entre la utilización de maltotriosa por parte de las cepas a ambas temperaturas, siendo también mejor a altas temperaturas.

Como propuesta de futuro sería muy interesante analizar, mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), componentes como el glicerol y ácido acético, ya que se ha descrito que son componentes producidos en abundancia en la cerveza y tienen gran influencia en el sabor y aroma. Finalmente se propondría estudiar si existe una correlación entre los resultados experimentales y las propiedades organolépticas de la bebida obtenida.



BIBLIOGRAFÍA

- [1] Buzzini P, Vaughan-Martini A. *Yeast Biodiversity and Biotechnology. Biodiversity and Eco-physiology of Yeasts*. Berlin, Springer. 2014.
- [2] Sicard D, Legras J. Bread, beer and wine: yeast domestication in the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Elsevier*. 2011;334(3):229-36.
- [3] Borneman A, Pretorius I. Genomic Insights into the *Saccharomyces sensu stricto* Complex. *Genetics*, 2015;199(2):281-91.
- [4] Carrau C, Gaggero, P, Aguilar S. Yeast diversity and native vigor for flavor phenotypes. *Trends in Biotechnology*. 2015;3(33):148-54.
- [5] Kopecká J, Němec M, Matoulková D. Comparison of DNA-based techniques for differentiation of production strains of Ale and Lager brewing yeast. *Sfam*. 2016;120(6):1561-73
- [6] Gallone B, Steensels J, Prah T, Soriaga L, Saels V, Herrera-Malaver B *et al*. Domestication and divergence of *Saccharomyces cerevisiae* beer yeasts. 2016;166(6):1397-1410.
- [7] Qiong W, George M, James M, James R. Naïve bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*. AEM. 2007;73(16):5261-67.
- [8] Wrent, P. Desarrollo de métodos moleculares para la detección y tipificación de cepas de levaduras con interés industrial. UCM. 2016.
- [9] Mukha D, Wiegmann B, Schal C. *Biochemistry of Insects and Molecular Biology. Evolution and phylogenetic content of ribosomal information from the DNA replication unit in Blattodea*. Elsevier. 2002;32(9):951-60.
- [10] Kuan L, Porras A, Kuske C, Eichorst S, Xie G. Accurate, rapid taxonomic classification of fungal large-subunit rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology*, AEM. 2012;78(5):1523-33.
- [11] Alves S, Herberts R, Hollatz C, Miletto L, Stambuk B. Maltose and Maltotriose Active Transport and Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *American Society of Brewing Chemists*. ASBC. 2007;65(2):99-104.
- [12] Chromacademy. Disponible en: <http://www.chromacademy.com/chromatography-headspace-GC.html>.
- [13] CromLab. Disponible en: <http://www.cromlab.es/>.
- [14] Sparkman O, Penton D, Kitson F. *Gas chromatography and mass spectrometry. A practical guide*. Burlington: Academic Press. 2011.
- [15] Harman K., Koohang A. *Learning objects: standards, metadata, repositories and LCMS*. California: IS. 2007.
- [16] Chris White. White Labs. EEUU: Chris White y asociados. Disponible en: <http://www.whitelabs.com/>
- [17] Colección Nacional de Cultivos de Levadura. Parque de investigación de Norwich: Carmen Nueno-Palop. Disponible en: <http://www.ncyc.co.uk/>.
- [18] Kopecká J, Němec M, Matoulková D. Comparison of DNA-based techniques for differentiation of production strains of ale and lager brewing yeast. *Applied Microbiology*. Sfam. 2016;120(6):1561-73.



- [19] Czerucka D, Piche T, Rampal P. Yeast as probiotics –*Saccharomyces boulardii* AP&T. 2007;26(6):767-78.
- [20] Vidgren V, Ruohonen L, Londesborough J. Characterization and functional analysis of the MAL and MPH Loci for the use of maltose in some strains of yeast ale and lager. *Applied and environmental microbiology*. ASM. 2005;71(12):784657.
- [21] Yoshihiro N., Takeshi K., Takehiko I., Yukiko K., Sandra R., Norihisa N *et al.* Genome Sequence of the Lager Brewing Yeast, an Interspecies Hybrid. *DNA research*, DNA res. 2009;16(2):115-29.
- [22] Pérez L. Obtención, estabilización y selección de levaduras híbridas de *Saccharomyces* de interés enológico. Valencia, UV. 2015.
- [23] Zambrano T, Raigón M. Evaluación de compuestos aromáticos en cervezas de producción ecológica y convencional. UPV. Disponible en: https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/60755/TFM%20TMZN_14485614336646101639562764350802.pdf?sequence=1.
- [24] Batxer E, Hughes P. Beer: Quality, Safety and Nutritional Aspects. UK, RSC paperbacks. 2001.
- [25] Maarse H. Volatile Compounds in Foods and Beverages. NY, Marcel Dekker. 1991.
- [26] Mencia G, Pérez R. Desarrollo de cerveza artesanal Ale y Lager con malta de maíz (*Zea mays*), cebada (*Hordeum vulgare*), carbonatada con azúcar y miel de abeja. Honduras, Escuela Agrícola Panamericana. 2016.



ANEXO

Receta para la producción de cerveza

MSc2017 IPA
American IPA (14 B)

Type: All Grain
Batch Size: 44,00 l
Boil Size: 55,34 l
Boil Time: 90 min
End of Boil Vol: 47,84 l
Final Vol: 43,00 l
Fermentation: Ale, Two Stage
Taste Notes:

Data: 13 Feb 2017
Brewer:
Asst Brewer:
Equipment: Braumeister 50 L
Efficiency: 74,00 %
Est Mash Efficiency: 77,6 %
Taste Rating: 30.0

Ingredients

Amt	Name	Type	#	%IBU
55.00 l	Jonsvalnet, Trondheim IPA	Water	1	-
22.00 g	GYPsum (Calcium Sulfate) (Mash 60.0 mins)	Water Agent	2	-
5.50 g	Baking Soda (Mash 60.0 mins)	Water Agent	3	-
5.50 g	Chalk (Mash 60.0 mins)	Water Agent	4	-
1.10 g	Epsom Salt (MgSO4) (Mash 60.0 mins)	Water Agent	5	-
0.00 kg	CIATCAU PALC ALC (0.5 CDC)	Grain	6	70.0 %
1.75 kg	WWhoat (6.0 EBC)	Grain	7	13.7 %
1.50 kg	Caramel /Crystal Malt – 30L (59.1 EBC)	Grain	8	11.8 %
0.50 kg	Corn Sugar (Dextrose) (0.0 EBC)	Sugar	9	3.9 %
0.02 g	Zinc Sulfate (ZnSO4 x 7H2O) (Boil 90,0 mins)	Water Agent	10	-
100.00 g	Target (9.00%) – Boil 60.0 min	Hop	11	46.6 IBUs
50.00 g	Chinook (13.00%) – Boil 15.0 min	Hop	12	16,7 IBUs
2.0 pkg	Safale American (DCL/Fermentis #US -0.5) (50.28 ml)	Yeast	13	-
150.00 g	Chinook (13.00%) – Dry Hop 7,0 Days	Hop	14	0.0 IBUs

Gravity, Alcohol Content and Color

Est Original Gravity: 1.066 SG
Est Final gravity: 1.011 SG
Estimated Alcohol by Vol: 7.5 %
Bitterness: 63.3 IBUs
Est Color: 19.8 EBC

Measured Original Gravity: 1.046 SG
MEasured Final Grvity: 1.010 SG
Actual Alcohol by Vol: 4.7 %
Calories: 427.1 kcal/l

Mash profile

Mash Name: Single Infusion, Light Body, No
Mash Out
Sparge Water: 35,66 l
Sparge Temperature: 75.6 C
Adjust Temp for Equipment: TRUE

Total Grain Weight: 12.75 kg
Grain Temperature: 22.2 C
Trun Temperature: 22.2 C
Mash PH: 5.20

Mash Steps

Name	Description	Sted Temperature	Step Time
Mash in	Add 32,45 l of water at 77.7 C	65.6 C	75 min

Sparge: Fly sparge with 35.66 l water at 75.6 C

Mash Notes: Simple single infusión mash for use with most modern well modifiedd grains (about 95% of the time).

Carbonation and Storage

Carbonation Type: Bottle
Pressure / Weight : 252.93 g
Keg/Bottling Temperautre: 21.1 C
Fermentation: Ale, Two Stage

Volume of CO2: 2.3
Carbonation Used: Bottle with 252.93 g Corn Sugar
Age for: 30.00 days
Storage Temperature: 18.3 C

